

な検査を迅速にすすめていきます。そして疑いがあれば即投与を中止する。われわれのところも、ゲフィチニブがよく効いている患者さんで、熱発し咳が出てきて、それでおかしいということでCTをとったら淡い陰影がみつき、その時点ですぐに投与を中止すると、1週間ではほとんどその陰影が消えたという症例を経験しています。そういった意味ではやはり早期に発見して、まず休薬する。それで必要ならばステロイドパルス療法をするというのがいまのベストという結論ですね。

中田 私はゲフィチニブという薬に大変興味を持っていますが、最適投与量が人によって違うんじゃないかという印象を持っています。いま曾根先生がおっしゃられた症例では、非常に効いているけれども、副作用がおこればすぐに中止して、また再開をすれば、その時には投与量を下げるということは可能かどうか。

曾根 それは非常に重要な問題で、患者さんにとっては、いままで抗がん剤治療を受けてきて効かない。最終的にゲフィチニブの治験に入って、効いた。今度は副作用が出てきた。もう投与できない。しかし投与しなければ、間質性肺炎で亡くなることはないが、がんがどんどんまた大きくなりがんが亡くなりますよね。その患者さんについては非常によく説明をして、希望が非常に強かったことから1日おきに250mgを投与して、で間質性肺炎を発症せずに維持できたという経験もあります。あくまで患者さんに、そういうインフォームドコンセントをきちっとして、このまま続けると、重篤な副作用を起こして死に至る可能性があるということをきちんと説明する。それでも希望される場合には投与量を減らすとか、あるいは間隔をあけるような、そういうトライアルもできるのではないかという感じはしております。

林 対象が肺がんという致死的疾患なので、通常の薬剤性肺炎の扱いとはちょっと違いますね。教科書的には疑いのある薬剤の再使用は禁忌でしょうが、有効性が期待できるがん治療薬であることへの配慮も当然必要でしょうね。

曾根 私共は第2相試験で27.5%の有効率がありましたので、昨年の1月から文部科学省のプロジェクトのひとつとして、薬剤応答性遺伝子の解析ということで、主に従来の抗がん剤の効かない肺腺がんを対象にゲフィチニブを投与する前に、肺がんの組織を取ってきて、約2万7,000個の遺伝子の解析を東大の中村祐輔教授との共同研究で進めております。実際に携わっておられるのが今日ご出席いただいている柿内先生です。肺がんの組織を採ることのむづかしさですね。気管支鏡下で採取してもがんの一部しか採れないし、非常に変形してもあります。その後のマイクロアレイ解析をするための検体として使えない場合が非常に多いですね。柿内先生、具体的にご説明いただけますか。

### 個別化医療への展開

柿内 先ほどお話がありましたように、疫学的なアプローチで女性、腺がんにゲフィチニブの有効率が高いことが示されたわけですが、それだけでは限界があります。分子生物学的なアプローチで個々の患者さんについて癌の個性を診断し、その個性に合わせた治療を行っていくということが必要だと思います。

曾根 いわゆるテーラーメイド医療、個別化医療ともいいますね。

柿内 その柱としては2つ。ひとつは、個々の患者さんから採取したがん組織の遺伝子発現プロファイルをもとに、それぞれの患者さんでゲフィチニブが効くかどうかを判定する感受性予測、もうひとつは遺伝子多型解析による副作用予測です。感受性予測は現在進行中で、副作用予測についても現在プロジェクトが始まろうというところです。私は感受性予測のほうを担当しておりますが、肺がんの組織、経気管支肺生検の検体は直径が1ミリ程度と非常に小さいので、微量サンプルで数万の遺伝子の発現を解析できるような技術開発を2年ほど前からはじめました。当時は手術標

本のような大きな組織でなければできなかったのですが、現在では、ちゃんとがん組織が採取できていれば、直径0.5ミリ程度の組織でも十分な解析が可能となっております。次に具体的な解析方法ですが、まずレーザーマイクロダイセクションという方法を用いて微量サンプルからがん細胞のみを選択的に採取し、がん細胞の遺伝子発現プロファイルをcDNAマイクロアレイを用いて取得しております。cDNAマイクロアレイは数千から数万の遺伝子発現をいちどきに調べることができる技術で、当研究室では、ヒトゲノムにコードされている遺伝子の70~80%程度をカバーしたcDNAマイクロアレイを作製しております。このcDNAマイクロアレイを用いてゲフィチニブを投与する前のがん組織の遺伝子発現プロファイルを取得し、感受性群と耐性群の発現情報を比較することで、感受性と関係のある遺伝子を同定しました。これらの遺伝子発現プロファイルをもとに感受性予測システムを構築し、現在感受性を正しく予測できるかどうか追加症例を用いて検討中です。この方法は、すでに慢性骨髄性白血病におけるメチル酸イマチニブ（グリベック®）の感受性予測ですでにその有効性が証明されておりますので、症例さえ集まれば近い将来、感受性予測が可能になるだろうと考えております。

曾根 大変な作業ですね。肺がんの患者さんからサンプルを採ったときに、cDNAマイクロアレイに掛けるためのサンプルを用意するのにどれぐらい時間がかかるのですか。

柿内 組織学的な分化度や組織の挫滅の程度等にもよりますが、半日から数日を要します。

曾根 それはひとりの患者さんからですか。

柿内 はい。ですので、感受性予測システムを臨床に応用するにはより迅速な測定方法の開発が必要と思います。

曾根 ゲフィチニブにしても、3割効いているが、逆にいえば7割のがん患者さんには効かない。3割の人をcDNAマイクロアレイで予測できれば、患者さんにとって非常に重要なことだし、もうひ

とつは、医療資源をいかに有効に使うかという点でものすごく大きなインパクトがありますね。

柿内 現在、cDNAマイクロアレイにて得られた肺がんの網羅的遺伝子発現情報を用いて、薬剤の感受性予測以外の解析も行っております。ひとつは、肺がんが早期から発現している遺伝子を同定して、マーカーとして利用できないか、それからがんが特異的に発現している遺伝子の中から、がんの増殖に関わる遺伝子を同定して治療の標的として使うことができないかということ。また、肺がんの治療において外科療法の適応があるかどうか判断する際、画像診断によりリンパ節転移の有無を判定しておりますが、感度、特異度が低いことが問題になっております。リンパ節転移を有する症例とない症例では発現プロファイルが異なっていることがわかってきましたので、術前の経気管支検組織でリンパ節転移の有無を判定するシステムの開発を行うなど、基礎研究で得られた知見を診断、治療両面で臨床応用できないか検討を行っています。

中田 ぜひやっていただきたい点があります。先ほどからゲフィチニブの副作用の問題がありましたけれども、もしかしたら、がんの部分マイクロダイセクションで採ってくるのではなくて、がんの隣接した正常部分をマイクロダイセクションで採ってきて、治療前と治療後で比べる。もしかしたら、たとえばII型上皮が産生しているサーファクタントの成分の転写が非常に不活発になっているとか、あるいは、なにかアポトーシス関連の遺伝子が誘導されているとか、そういうような所見がわかって副作用の機序もわかるかもしれない。ぜひそういうものもやってほしいと思います。

曾根 先ほど申されたように、ゲフィチニブの副作用については、とくに間質性肺炎、急性肺傷害がおこる人、おこらない人、これは遺伝子多型の解析が今後進められる予定です。しかし、SNPsというのは、ゲノムを扱うということで、倫理性を担保にしなければいけない。個別化医療の確立という点では、ひとつは有効性をみるcDNAマイ

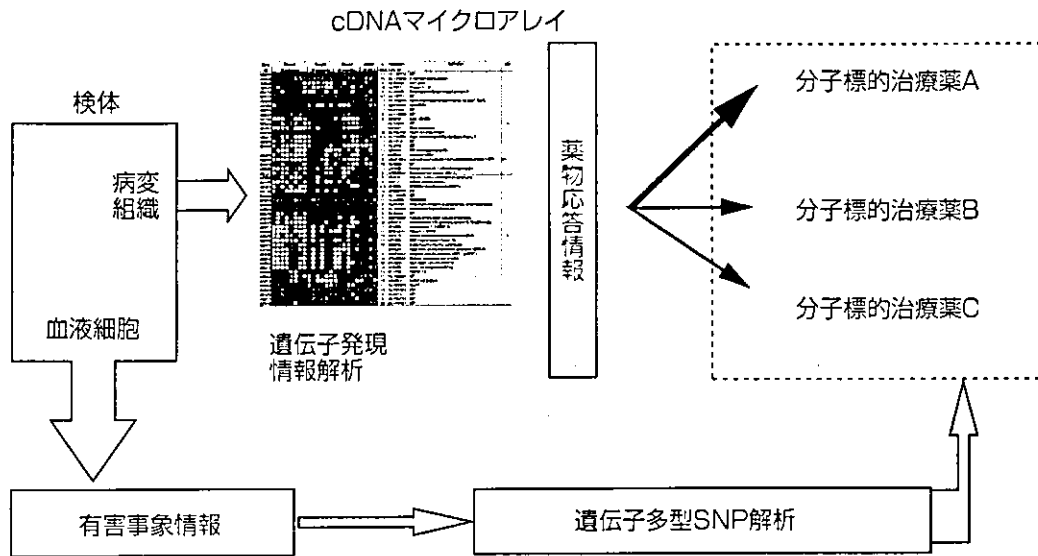


図. 分子標的薬：個別化医療への展開

クロアレイ解析, もうひとつは安全性という観点からのSNPs解析が重要なアプローチであると思います(図). こういったことができるようになったのも, やはり分子生物学の進歩が急速に臨床の場に貢献できるような形になってきたからだと思います. それを橋渡しするトランスレーショナルリサーチはやはりわれわれがやらなければいけないと思いますね. 最近, プロテオミックス解析, プロテームといった, 蛋白を直接とらえる技法も使われるようになってきております. 病態に関わる重要な蛋白分子が解明されるとますます個別化医療という形で診断, 治療が展開していくのではないかと思います. 最後に一言ずつ, 21世紀, これから呼吸器学はどのように発展するのか, あるいは発展させたいのか, してほしいのかという点で一言, お願いします.

#### 今後の展開に向けて

河野 いま私が思っていますのは, ベンチャーを立ち上げていくような方向に呼吸器の先生方も視点を向けないと, ますます取り残されるのではないかと思います. たとえばKL-6に関して1984年にはすでに名前を付けましたが, 検査項目として認可されるのに1999年までかかりました. ベ

ンチャーの条件として, シンプル, スピーディー, システムチックと, 3Sの重要性がいられています. 韓国ではすごい勢いで取り組んでいます, 日本ではまったく立ち遅れていて, 悲劇的です. そういうベンチャーを立ち上げ, 第一線の臨床で応用できる魅力的な呼吸器病学の知識や技術をつくっていく時代に来ていると思っています.

曾根 基礎生命科学の成果をいかに臨床へ橋渡しするのか. そのためにはきちんとした臨床試験が必要だし, その原動力となるのがひとつはベンチャー起業だということですね.

曾根 中田先生はいかがでしょうか.

中田 私はまた別な視点かもしれないですが, やはり臨床検体を使った研究はものすごく重要であると思います. 倫理問題とかいろいろなことがあってなかなか大変だと思いますが, 日本の呼吸器分野は, もっと検体利用を通して共同研究を進めるべきではないか. DNAに限らず, たとえば肺の洗浄液の上清だとか細胞だとか, あるいは生検の標本だとか, そういうものが相互に融通しあえるシステムをつくっていく必要がありますね. あまりにも小さなグループに分かれて研究が小規模になっているので, それをもっと広く進めてほしいと思います. やはり, 臨床家が研究できるシステムを支援していくということが重要なことと思

います。

曾根 非常に重要な点ですね。アメリカなんかでは、リサーチリソースセンターというか、研究資源をきちんと保存管理してみんなで使えるようなシステムが整備されています。日本では今後の重要な課題と思います。

林 間質性肺炎の病因・病態の理解は、がんや肺胞蛋白症に比べてはるかに遅れています。この疾患の病態の解析や治療法の開発には遺伝子導入は重要な手法となっています。有望な治療理論を提唱できた場合、有効性の確認には前臨床段階の検討が必要ですが、莫大な費用と人力が必要となります。臨床応用にはベンチャーという方法もありますが、ノウハウをすでに持っている企業の参画があれば速やかに進むものも多いただろうと思われれます。私が所属する施設は、臨床研究センターを有し、活発な研究活動も行っています。大学や国立の研究施設と企業の関係がより緊密になればと希望します。

曾根 最近、産学連携とか、トランスレーショナルリサーチの推進という形のプロジェクトが国をあげて進んでおります。日本の基礎研究成果は国際レベルにあります。臨床に持っていけない。その原因として法的に多くの規制があることも一因です。しかし、今回、医師主導の治験と

いう薬事法の改正があって、この7月に省令化が予定され、解決すべき問題はまだまだありますが、橋渡し研究が行える社会環境になってきつつあります。いま先端的な研究をしっかりとされている柿内先生から、将来どのように貢献したいかということをお話ください。

柿内 現在取り組んでおりますが、遺伝子発現に基づいた薬剤感受性予測や、遺伝子多型解析による副作用予測など、個別化医療の実現に少しでも貢献できればと考えております。しかし、これらの解析には少なくとも数百人規模の患者さんの協力が必要となりますので、いかに臨床と基礎が協力をしていくことができるかということが問題となっています。臨床から基礎にきて勉強をしている私としては、将来その橋渡しの一助になればと考えております。

曾根 きょうは本当にお忙しい中お越しいただきありがとうございました。呼吸器学の分野も斬新な分子細胞生物学的情報や技術を取り入れ、難病とされている疾患に対して分子診断から分子標的治療へと画期的な展開が見られ、個別化医療へと確実に前進していることが明らかになりました。先生方には、今後ますますのご活躍を祈念して座談会を終わらせていただきます。

---

---

呼吸器疾患の新たな展開：病態局面から分子標的制御へ

---

---

III. 新たな分子標的治療と臨床問題

3. 肺胞蛋白症

中田 光

## トピックス

## III. 新たな分子標的治療と臨床問題

## 3. 肺胞蛋白症

中田 光

## 要 旨

特発性肺胞蛋白症は末梢気道にサーファクタントが貯留する希な疾患である。1994年、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 欠損マウスは肺胞蛋白症を発症することが報告された。このマウスの肺胞マクロファージには分化障害があり、その結果、サーファクタントの分解が障害され、発症する。次いで、筆者らは、99年、病原物質として患者の肺及び血液に抗GM-CSF自己抗体が大量に存在することを明らかにした。これらの成果をふまえて、近年治療法としてGM-CSFの連日投与が有効であることがわかり、我が国でもGM-CSF吸入による重症特発性肺胞蛋白症の治療研究が開始された。

〔日内会誌 92：1279～1283, 2003〕

**Key words**：特発性肺胞蛋白症, 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子, 吸入療法, 肺胞マクロファージ

## はじめに

肺胞蛋白症は肺胞及び呼吸細気管支内にリン脂質とサーファクタントアポ蛋白が貯留する希な疾患である。貯留するのは、主として蛋白ではなく、リン脂質であることから、肺胞リポ蛋白症 (alveolar lipoproteinosis) ともいう。1958年にRosenらにより、肺胞腔内にリン脂質とサーファクタントアポ蛋白が過剰に貯留する肺疾患として報告されて以来40年以上、肺胞蛋白症は病因不明な奇病として一部の呼吸器科医、病理医の興味を引くのみであった。基礎疾患のない患者に発症する肺胞蛋白症は特発性肺胞蛋白症とよばれ、全患者の90%を占めるが、近年、その分子病態が内外の研究者により解明され、その成果に基づくGM-CSF療法が確立された。この一連の成果は、巷に必要性が叫ばれているト

ランスレーショナルリサーチの典型であり、呼吸器内科学の世界では希にみる急速な進展である。本稿では、その経緯を概説し、実際の治療例について述べる。

## 1. 肺胞蛋白症モデルマウスの発見

1994年、Dranoffらにより、顆粒球マクロファージ刺激因子 (GM-CSF) の欠損マウスは肺胞蛋白症を発症することが報告された。彼は、当初、骨髓細胞や血球系細胞に異常がおこることを期待したが、出来上がったマウスには両者とも全く異常が見られなかった。研究者たちはがっかりしたが、12週経ってマウスは死に、解剖したら、肺胞蛋白症にそっくりの病変が肺にのみ出来ていたわけである。続いて、NishinakamuraらによりGM-CSF受容体β鎖の欠損マウスでも本症を発症すること、また先天性の症例にβ鎖の変異が見つかったことから、GM-CSFのシグナルの異常が肺胞マクロファージの機能低下を惹起し、

なかた こう：国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

サーファクタントの分解が障害されている可能性が示唆された。Ikegamiらは、GM-CSF欠損マウスに放射性ヨードラベルされたサーファクタントプロテイン Aや飽和phosphatidil cholineを経気道的に肺に注入したところ、その肺における吸収・分解がnormal littermateに比べて極端に低下していることを報告している。ついで、Yoshida, Shibataらはこの原因が肺胞マクロファージのサーファクタント分解能の障害によることを示した。

## 2. 抗GM-CSF自己抗体の発見

GM-CSF欠損マウスが肺胞蛋白症にそっくりの病変を呈することを知って、ヒトの肺胞蛋白症でもGM-CSFあるいはその受容体に異常があるのではないかと各国の研究者がしのぎを削って調べた時代が数年続いた。先天性肺胞蛋白症のごく一部にGM-CSF受容体common  $\beta$ 鎖の異常が見つかったことを除いてこのような試みは、ことごとく失敗に終わった。

私は1987年以来、ヒト肺胞マクロファージの分化・増殖に及ぼすGM-CSFの働きについて研究していた。その過程で、特発性肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液には、泡沫状マクロファージとともに単球と区別がつかない未分化なマクロファージ集団があることに気がつき、患者の肺ではGM-CSFの生物活性が障害されているのではないかと考えていた。

1997年、当時東大医科学研究所にあった微生物株保存施設という年間予算120万円足らずの貧しい施設の一人助手のポストについていた頃、長年温めてきたこの研究を始めた。近代的な実験の設備はなく、借りてきた旧式の蛋白精製装置があるのみであった。しかし、応援してくれる呼吸器内科の友人知人が沢山いて、またたく間に特発性肺胞蛋白症の気管支肺胞洗浄液11例分が集まった。それを材料にマクロファージの増殖を抑制する物質を追求し、2年半かかって

それが、抗GM-CSF自己抗体であることを突き止めた（この発見の経緯についてはこれまで何度も書いたので割愛させていただく）。マウスモデル同様、ヒトの特発性肺胞蛋白症においてもGM-CSFのシグナル伝達の障害が病因である可能性が高まった。また、抗GM-CSF自己抗体を簡便に検出する方法を開発し、血清診断が可能になった。

## 3. GM-CSF療法の発見

東大医科研の小さな研究室で特発性肺胞蛋白症のどろどろした肺胞洗浄液と格闘していた頃、オーストラリアとスイスでは、特発性肺胞蛋白症の病因がGM-CSFに対するマクロファージの反応性の低下にあると考えた医師がいた。彼らは皮下注で連日GM-CSFを投与すれば改善するのではないかと考え、実行した。結果は、13例投与して6例が著明に改善した。

1999年、私は抗GM-CSF自己抗体発見の研究成果を発表するためにボストンで開かれたアメリカ胸部学会に出席し、初めてGM-CSF療法のことを知った。私は抗GM-CSF自己抗体が病因であると主張していたから、抗原であるGM-CSFを患者に投与するのは火に油を注ぐものだと考えて、違和感を覚えたが、試しにスイスの医師Otto Schochに治療前後の血清と気管支肺胞洗浄液を送ってもらってその自己抗体価を測定した。結果は驚くべきものだった。血清中の自己抗体価は治療前に比べて治療後は60%程度であったが、気管支肺胞洗浄液中のそれは、治療6週後、12週後には検出限界を下回っていた。GM-CSFは皮下注で投与されていたから、肺の中に大量にある自己抗体が中和により消失したとは考えにくく、おそらく肺に脱感作による抗体消失が起こっていると思われた。

## 4. 我が国のGM-CSF吸入療法第1例目

GM-CSF皮下注療法の効果に感嘆していた頃、

表. GM-CSF 吸入療法前後の臨床データ

		症例 1		症例 2		症例 3	
		治療		治療		治療	
		治療前	12 週後	治療前	12 週後	治療前	12 週後
動脈血ガス (room air)	PO <sub>2</sub> (mmHg)	34.5	56.9	66.4	94.4	43.0	72.9
	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	40.3	36.2	40.1	33.1	37.2	36.5
	A-a DO <sub>2</sub> (mmHg)	65.1	47.9	33.5	14.2	62.2	33.1
呼吸機能	VC (L)	1.95	2.26	2.96	3.30	2.20	2.82
	FEV <sub>1.0</sub> (L)	1.84	1.97	2.53	2.62	1.93	1.92
	%DLco	38.0	44.3	43.6	48.9	34.2	57.4
血清マーカー	CEA (ng/ml)	11.9	3.1	13.4	3.7	31.3	2.8
	KL-6 (U/ml)	10,950	2,303	11,010	1,654	39,800	1,690
	SP-D (ng/ml)	312	135	194	114	292	66.6
	CRP (mg/ml)	0	0	0.6	0.6	0.12	0.08
	抗 GM-CSF 抗体 ( $\mu$ g/ml)	30.54	21.85	53.01	33.74	238.0	115.2
気管支肺胞洗浄液 所見	Cell count ( $\times 10^4$ /ml)	2.9	15.9	4.0	16.2	7.5	27.1
	Macrophage (%)	62	76	66	94	46.6	24.4
	Lymphocyte (%)	29	21	32	4	40.2	75.6
	Neutrophil (%)	9	3	2	1	12.4	0
	Eosinophil (%)	0	0	0	1	0.4	0
	CD4/8 ratio	2.21	2.21	3.22	1.90	1.73	5.03
	抗 GM-CSF 抗体 ( $\mu$ g/ml)	1.38	0.10	0.58	0.01	5.4	0.195
6 分間歩行試験	pre-SpO <sub>2</sub> (%)	93	97	95	96	93	97
	post-SpO <sub>2</sub> (%)	77	95	87	90	77	95
	Distance (meter)	220	322	440	545	220	322

東北大学加齢研貫和教授から、特発性肺胞蛋白症の重症例の治療について相談を受けた。外来受診された患者の動脈血酸素分圧は 37mmHg で、貫和教授は大変驚かれたが、患者はすたすと歩くことができたという。二度全肺洗浄療法を受けたが効果なく、2000 年夏には在宅酸素療法が開始され、やがて患者はほとんど寝たきりの状態になった。教室の田澤助手は、GM-CSF 皮下注ではコストがかかりすぎること、スイスでの治験の情報から悪寒などの副作用があることから、GM-CSF を 250 $\mu$ g/日隔週連日で 12 週間吸入で投与することを決め、医学部の倫理委員会、厚労省医薬局の薬鑑証明など煩雑な手続きを粘り強くこなして半年かかってスイスより輸入し、2000 年 12 月に国内初の GM-CSF 吸入療法が実現した。

患者は治療 6 週目までは呼吸機能、血液ガスともに改善なく、治療を続行すべきか否か判断に迷ったが、血清マーカーである CEA (carcinoembryonic antigen) が下がり始めたこと、6 週目に行った BAL (bronchoalveolar lavage) に小さな未熟マクロファージが多く見られたこと、自己抗体価が激減していたことから、続行した。8 週目頃より患者の動脈血酸素分圧は徐々に改善し、結局治療前 34mmHg であったのが、治療後 56mmHg まで上昇して歩いて退院することができた。

## 5. パイロットスタディーの成果

その後、東北大学、近畿中央病院で各 1 例の重症特発性肺胞蛋白症に吸入療法は試され、い



ずれも劇的に改善している。3例の治療前後の臨床データを表に示した。呼吸機能では肺活量(VC (l))の改善が目立ち、症例3を除いて肺拡散能(%Dlco)の改善は顕著でなかった。肺胞蛋白症の血清マーカーではCEA, KL-6が劇的に減少した。興味深いのは、気管支肺胞洗浄液所見で、治療前に存在した抗GM-CSF自己抗体のレベルがほぼ測定限界あるいはそれ以下に低下したことである。これに対し、血清中の自己抗体の動きは少なかった。気管支肺胞洗浄液中の細胞は治療前に比べて3~5倍増加し、肺胞蛋白症に特徴的なproteinous debrisも著明に減少した。

## 6. 全国規模の多施設II相試験

現在、GM-CSFが国内で認可されていないことから、重症患者がいても医師による個人輸入によるしか手に入れるすべがない。1例治療するの

にかかる費用の約150万円を誰が負担するのかという問題になると、難病指定も取られていないことから、複数例の治験は困難であると思われる。ましてや、この画期的な治療法を呼吸器科医に認めてもらい、普及させることなど不可能と諦めていた。しかし、私や貫和教授のもとには患者自身や主治医からのGM-CSF療法を受けられないかという問い合わせが相次いだ。

平成14年5月、厚生労働省が基礎研究成果の臨床応用推進研究事業を公募することとなり応募したところ、採択され、「GM-CSF吸入による重症特発性肺胞蛋白症の治療研究」班(班長中田)が発足した。平成15年3月より全国7施設での医師主導治験が開始された。現在6例の重症患者が治験登録され、16年3月までに12~16例の治療を行う予定である。

治験に先立って、研究班を中心に多施設統一プロトコールが作成された。その骨子は以下の

### GM-CSF吸入による重症特発性肺胞蛋白症の治療研究プロトコールの概略

治験目的：特発性肺胞蛋白症患者を対象に、GM-CSF吸入療法の安全性について漸増法を用いて有害事象の発現を指標として検討し、治療効果を調べる。

対象：安静時room airで動脈血酸素分圧(PaO<sub>2</sub>) < 70mmHgの特発性肺胞蛋白症患者

用法・用量

- a) 無治療観察期間：12週間、無治療で観察する。6週、12週において後述する観察項目について検討する。
- b) 治療期間：12週間の無治療観察期間の後、治療開始の適否を検討し、125μg/日 吸入6週後、後述する治療効果判定を行い、有効と判断された被験者についてはそのまま、125μg/日 吸入を6週間行い、無効と判断された症例については、250μg/日 吸入を6週間行う。

目標症例数：27例

試験方法：中央登録方式による7施設共同オープン試験

主たる評価項目

- ①無治療観察期間：自然寛解の有無
- ②治療期間：治療前に対する治療6週、12週後の肺胞一動脈血酸素分圧較差の改善。

評価方法

定期的(観察時期については後述)に臨床症状、胸部X線写真、胸部CT(HRCT)検査、動脈血液ガス分析、呼吸機能検査、気管支肺胞洗浄検査、6分間歩行試験を行い、各パラメータについて無治療観察期間と治療期間の間で比較を行う。

試験実施期間

平成15年3月1日~平成17年2月28日

ようなものである。

おわりに

特発性肺胞蛋白症は働き盛りの男性に多い。治験に先立って、全国調査を実施したところ、185例の情報が寄せられ、うち46例が動脈血酸素分圧が70mmHg未満だった。中には、在宅酸素療法を受けている若年者もいた。この治験の一番の目的は、このような重症の患者を一例でも多く回復させることである。読者の中にこのような患者をご存じの方がいたら、是非ご一報いただきたい。

## 文 献

- 1) Trapnell B, et al: Pulmonary alveolar proteinosis; mechanism of disease. *New Engl J Med*. in press
- 2) Schoch OD, et al: Bronchoalveolar lavage findings in pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with GM-CSF. *Thorax* 57, 277-280, 2002.
- 3) 中田 光: 肺胞蛋白症 高久史磨 尾形悦郎 黒川 清 矢崎義雄 編 新臨床内科学第8版医学書院 2002, 275-277.
- 4) Seymour JF, et al: Therapeutic efficacy of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 524-531, 2001.
- 5) Kitamura T, et al: Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J Exp Med* 190(6): 875-880, 1999.

特集●免疫学からみた呼吸器疾患

---

特発性肺胞蛋白症の  
抗GM-CSF自己抗体をめぐる諸問題  
—開け放たれたパンドラの箱

中田 光    内田寛治    濱野栄美  
寺川貴裕    慶長直人

# 特発性肺胞蛋白症の抗 GM-CSF 自己抗体をめぐる諸問題—開け放たれたパンドラの箱

中田 光, 内田寛治, 濱野栄美, 寺川貴裕, 慶長直人

特発性肺胞蛋白症の肺胞洗浄液上清が単球やマクロファージ細胞株の増殖を強く抑制することを見出し、この活性の精製を試みたところ、GM-CSF 特異的な中和抗体であることを確認した。また、この中和抗体は患者血清中にも存在することを見出した。この抗体は特発性の患者血清および肺洗浄液においてのみ検出され、続発性、先天性の患者からは検出されなかった。特発性肺胞蛋白症においては、なんらかの原因で GM-CSF 中和自己抗体が産生され、肺胞中の GM-CSF の生物活性を中和することにより、単球からの肺胞マクロファージへの分化と肺胞マクロファージの機能が抑制され、サーファクタントの分解が障害され発症するのではないかとと思われる。

## Key words

pulmonary alveolar proteinosis, surfactant, GM-CSF, auto-antibody

特発性肺胞蛋白症 (idiopathic pulmonary alveolar proteinosis ; IPAP) は、肺胞および終末気管支に過剰なサーファクタントの貯留が認められるまれな疾患である。1994 年から 1997 年にかけて、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) あるいはそのレセプター  $\beta$  鎖欠損マウスは肺胞蛋白症を発症することが報告された。GM-CSF シグナルの異常が肺胞マクロファージの機能低下を惹起し、サー

ファクタントの分解が障害されている可能性が示唆された。肺胞蛋白症のうち 90 % を占める IPAP は長い間原因不明であったが、筆者らは 1999 年、IPAP の血清および肺に抗 GM-CSF 自己抗体が高濃度に存在していることを発見し、本症の発症に GM-CSF の機能異常が関与していることを示した。しかし、そのことがまた、いくつかの難問を生むパンドラの箱となった。なぜサイトカインに対する自己抗体ができるのか、患者では全身に抗 GM-CSF 自己抗体が存在するのになぜ肺だけに病変ができるのか、GM-CSF の投与によりなぜ一部の患者で呼吸機能が改善するのかなどは、これからの課題である。本稿では、肺のホメオスタシスの維持機構について概説し、その破綻により起こる肺胞蛋白症の発症機序について述べ、また残されたいくつかの問題について今後の研究の方向性を考察する。

## Enigma of the auto-antibody in idiopathic pulmonary alveolar proteinosis

Kou Nakata Kanji Uchida Emi Hamano  
Takahiro Terakawa Naoto Keicho

国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

なかた・こう 1977 年東京大学農学部卒業、83 年京都大学医学部卒業。東芝中央病院、東京大学医科学研究所、結核予防会結核研究所などに勤務後、92 年ニューヨーク大学医学部留学。2000 年国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部研究室長 (現在に至る)、2002 年杏林大学医学部第一内科非常勤講師 (兼任)。現在の研究テーマは、① 特発性肺胞蛋白症の抗 GM-CSF 自己抗体の性状解明、② GM-CSF 吸入による重症特発性肺胞蛋白症の治療研究、③ エイズ合併結核の分子病理。

## GM-CSF と肺胞マクロファージの機能

### 1. GM-CSF のシグナル伝達機構

GM-CSF は 23 kDa の糖タンパク質で、その名が

示すとおり、顆粒球系細胞の増殖因子として発見されたが、その後、抗原提示細胞の分化や上皮細胞の機能発現に関与していることが明らかになり、現在では分化や機能を調節する因子として注目されている。GM-CSFは、マクロファージやリンパ球、上皮細胞、血管内皮細胞などから産生されている。一方GM-CSFレセプターは、顆粒球系細胞表面のほか、一部の上皮細胞表面にも発現している。低親和性の $\alpha$ 鎖1本とIL-3、IL-5などと共通のcommon  $\beta$ 鎖2本から成る。GM-CSFが $\alpha$ 鎖に弱く結合すると、 $\beta$ 鎖が細胞膜上を移動し、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、GM-CSFおよび $\beta$ 鎖に結合しているJAK2から成る複合体を形成し、 $\beta$ 鎖のチロシン残基をリン酸化する。この反応が細胞内シグナル伝達タンパク質の活性化の引き金となっている(図1)。

## 2. 肺泡マクロファージの起源と増殖

肺泡マクロファージを含む組織マクロファージの起源については、Van Furthによる単核食細胞学説やAchoffらの細網内皮学説など百年にも及ぶ論争があったが、肝造血が始まる前の胎生早期に肺の原器にはすでにマクロファージが存在すること<sup>1)</sup>、血中単球がほとんどない化学療法後の患者の肺でも肺泡マクロファージの数は減少しないこと<sup>2)</sup>、また同種骨髄移植後に最終的に肺泡マクロファージはドナーの細胞に入れ替わること<sup>3)</sup>から、現在では肺泡マクロファージの前駆細胞が肺局所にあつて局所増殖したものと、骨髄由来の単球が肺に流入し、肺局所でサイトカインの作用により肺泡マクロファージに分化したものがあるという二元説が広く受け入れられている。肺泡マクロファージの増殖を*in vitro*で調べると、その形質を維持しつつ増殖を促しているのはGM-CSFである。ヒトの肺はGM-CSFを恒常的に生産しており、肺泡マクロファージはGM-CSFが豊富な環境下で自己増殖し、また、流入してきた単球はGM-CSFの働きで肺泡マクロファージへと分化すると考えられる。

## 3. GM-CSF欠損マウスにおける肺泡マクロファージの表現型

GM-CSFおよびそのレセプターの欠損マウスは

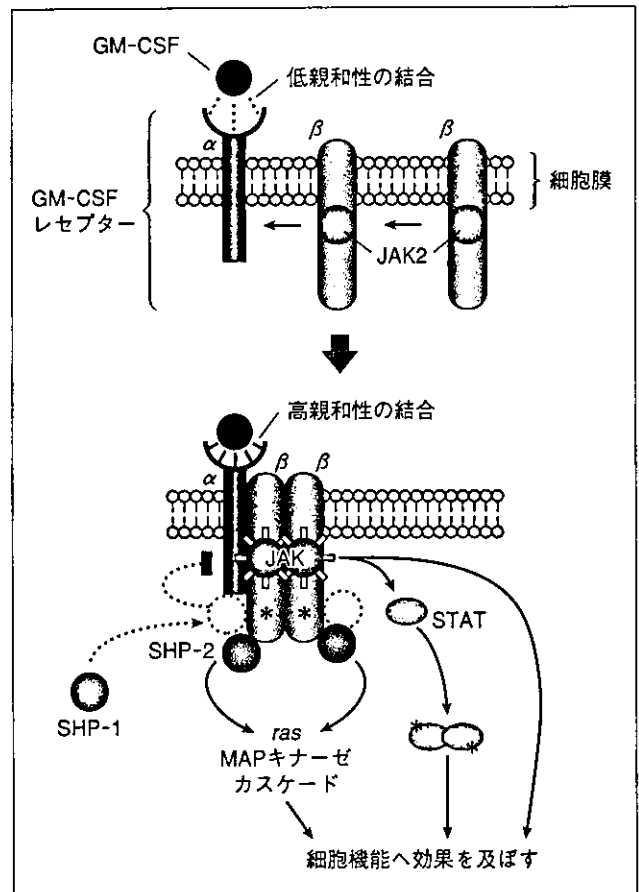


図1 GM-CSFのシグナル伝達モデル

GM-CSFはまず、低親和性GM-CSFレセプター $\alpha$ 鎖に結合し、その複合体がcommon  $\beta$ 鎖とJAK2の複合体と合体すると高親和性の複合体となる。この反応によりJAK2は活性化し、レセプターのチロシン残基をリン酸化する。リン酸化されたレセプターの細胞内ドメインはSTAT5、SHP-2を含むSrc-homology-2 containing proteinと結合し、それらがリン酸化される。これが、シグナル伝達の初期段階である。(Trapnell BC & Whitsett JA : GM-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol* 64, 775, 2002より引用)

骨髄血液系細胞に異常がなく、肺にのみ病変をもたらす、肺泡蛋白症を発症する。その肺泡マクロファージを観察すると、肺サーファクタントタンパク質A (SP-A)の吸収は正常な同腹仔よりも速いが、分解が障害されている<sup>4)</sup>。Trapnellらは、GM-CSF欠損マウスの肺泡マクロファージはmaturation arrestを起こしており、付着能、貪食能、殺菌能、TNF- $\alpha$ 、IL-6などのサイトカイン産生能、Toll like receptor発現などがすべて低下していると報告している<sup>5)</sup>。また、このマウスでは代償的にマクロファ

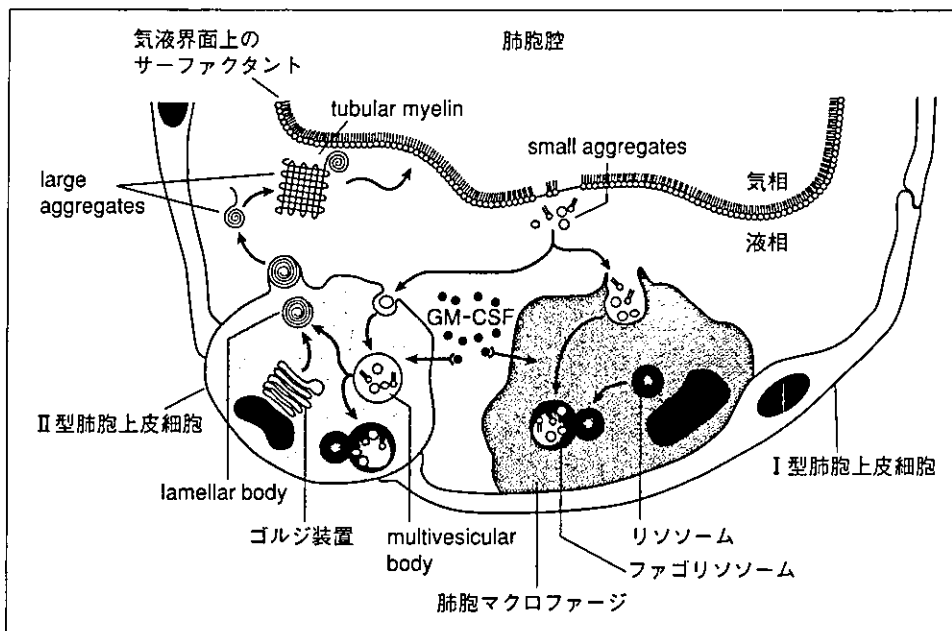


図2 サーファクタント代謝の模式図

サーファクタントはII型上皮で産生され、ゴルジ装置のなかで修飾を受ける。ゴルジのなかでリン脂質とサーファクタントタンパク質はlamellar bodyとして存在し、肺胞表面に放出されると格子状のtubular myelinとなり、表面を覆う。また、リン脂質の一部はサーファクタント液の気相表面に移動し、脂質層を形成する。サーファクタントは機械的、化学的に変性すると、II型上皮および肺胞マクロファージにより取り込まれ、分解あるいは再生される。

(Trapnell BC et al : *Annu Rev Physiol* 64, 775, 2002 より引用)

ージコロニー刺激因子 (M-CSF) の産生が亢進しており、肺胞マクロファージの数は保たれている。興味深いことに、このマウスに転写因子PU.1を肺にのみ強発現させると、これらの肺胞マクロファージ機能異常はすべて改善し、肺胞蛋白症から回復する。

### 肺胞マクロファージの機能とサーファクタントの代謝

肺胞および末梢気道の表面は、サーファクタントと呼ばれる粘稠な液体で覆われている。肺が虚脱せずに、膨張収縮を繰り返すのはこの液体のおかげである。サーファクタントの成分の90%はリン脂質であり、残りはサーファクタントタンパク質A, B, C, D (SP-A, B, C, D) である。サーファクタントリン脂質とSP-A~Dは、肺胞上皮細胞のうちII型上皮から産生される。II型上皮のなかでは、サーファクタントはlamellar bodyとして存在し、肺胞腔に放出されると格子状構造をとる (tubular myelinという)。格子状のサーファクタントは肺胞上皮の上を膜を形成して覆う (図2)。サーファクタントの50%は、II型上皮に再吸収されリサイクルして放出される。一方、サーファクタントの分解は肺胞マクロファージとII型上皮で行われていると考えられて

いる。モデルマウスが示すように、肺胞マクロファージの maturation arrest によりサーファクタントの分解が障害され、肺胞蛋白症を惹起する。

### ヒト特発性肺胞蛋白症に存在する抗GM-CSF自己抗体

ヒトIPAPで肺胞に貯留しているサーファクタントの成分を調べると、SP-Aとリン脂質のうちジパルミトイルホスファチジルコリン (dipalmitoylphosphatidylcholine ; DPPC) の割合が増加しているが<sup>6)</sup>、両者ともに健常な肺胞マクロファージによりよく吸収分解される<sup>7)</sup>。また、患者の肺胞洗浄液中の肺胞マクロファージは遊走能、異物貪食能などの機能低下がみられることから、マウスモデル同様に、本症の原因はサーファクタントの過剰産生にあるのではなく、サーファクタントの分解吸収を行う肺胞マクロファージの機能低下にあると考えられるようになった。

筆者らは、ヒトIPAPもGM-CSFの生物活性が障害されて肺胞マクロファージの分化と増殖が障害される結果、発症してくるのではないかと考え研究を進めてきた。そのなかで、IPAPの患者肺胞洗浄液が単球の増殖を強く抑制することを見出した。この洗浄液は、GM-CSFあるいはIL-3依存的に増殖す

るマクロファージ系細胞株TF-1のGM-CSF存在下での増殖も阻害するが、IL-3存在下での増殖にはまったく影響を与えないことから、GM-CSF特異的に働く物質の存在が示唆された。13例の肺胞蛋白症と10例の健常者の肺胞洗浄液を用いて調べたところ、この抑制は11例のIPAPの肺胞洗浄液においてのみみられ、2例の続発性肺胞蛋白症および健常者の肺胞洗浄液にはみられなかった<sup>8)</sup>。<sup>125</sup>I-GM-CSFを用いた実験で、IPAPの洗浄液はGM-CSFレセプターには影響を与えないことを確認し、また、洗浄液タンパク質との架橋実験から、GM-CSF結合活性が存在することを発見した<sup>9)</sup>。ウェストウエスタン法により<sup>125</sup>I-GM-CSFと肺胞洗浄液中のタンパク質の結合を調べると、11例のIPAP全例で180 kDaの単一なバンドが検出され、続発性肺胞蛋白症、種々の肺疾患、健常者の洗浄液にはまったくバンドが検出されないことから、GM-CSF結合タンパク質が疾患特異的に存在していると考えられた。そこで、患者肺胞洗浄液をブタノール抽出により脱脂し、透析後、5種のカラムクロマトグラフィーを行いSDS非還元ゲル電気泳動上180 kDaの単一タンパク質を得た。このタンパク質を還元状態で電気泳動すると57 kDaと28 kDaのバンドが得られ、57 kDaのバンドのN末端アミノ酸シーケンス決定を行ったところ免疫グロブリンH鎖のそれに一致し、ウェスタンブロット法、プロテインA結合性などからIgGであることを確認した。精製したIgGは、<sup>125</sup>I-GM-CSFと結合し、過剰量の非放射性GM-CSFの存在で阻害された。また、この抗体はTF-1細胞のGM-CSF存在下における増殖を阻害するが、IL-3の存在下の増殖は阻害しなかったことから、GM-CSF特異的な中和抗体であることが確認された。

これまで、肺胞蛋白症の病因解明の研究は主として疾患モデルマウスにおいて行われ、ヒトにおいてもGM-CSFと本症との関係が指摘されてきた。本研究においてはじめてその関連が物質レベルで明らかにされた(図3)。

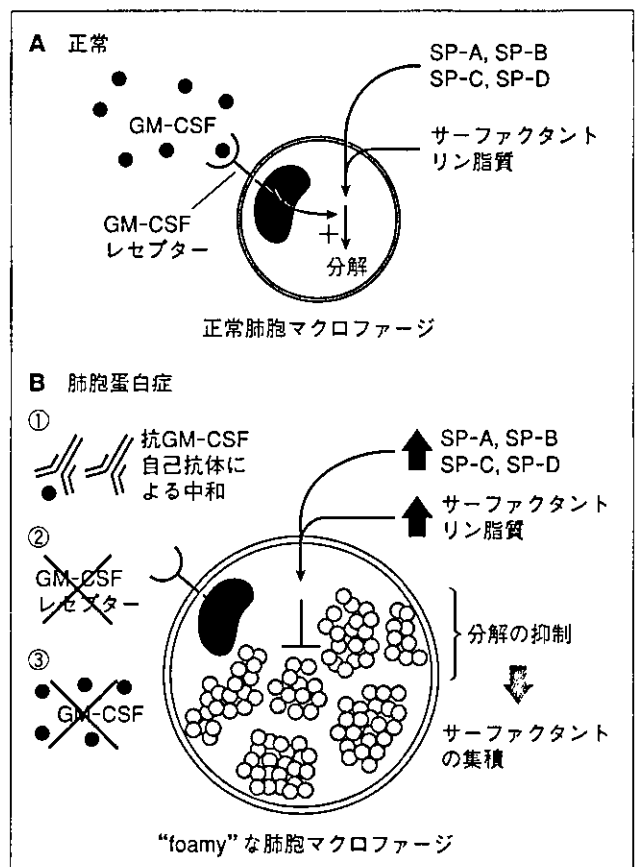


図3 ヒトおよびマウス肺胞蛋白症の発症機序

- A: 正常肺胞マクロファージではGM-CSFが分化を誘導し、サーファクタントタンパク質とリン脂質を分解する。  
 B: GM-CSFのシグナル伝達異常により、肺胞マクロファージの分化が障害される。①抗GM-CSF自己抗体により肺内のGM-CSFが中和される。②ヒトおよびマウスにおいてGM-CSFレセプターの変異があるとシグナル伝達異常により分化が障害される。③マウスにおいてGM-CSF自体の欠損により、やはり分化が障害される。

### 自己抗体価の病勢相関

その後、この自己抗体はIPAPの患者血清中にも存在することが判明した<sup>10)</sup>。しかし、抗GM-CSF自己抗体はごく一部(0.3%)の健常者でも血清中にもっていること<sup>11)</sup>や、重症筋無力症の患者の一部にこの自己抗体が存在すること<sup>12)</sup>、ほとんどの免疫グロブリン製剤中にも抗GM-CSF自己抗体が検出されることから、精製自己抗体を標準タンパク質として定量できるELISA系を確立し、現在までに内外のIPAP 107名の血清を測定し、健常者80名、重症筋無力症20名、他の肺疾患30名の自己抗体価と比較したところ、IPAPが平均 $123.2 \pm 9.4 \mu\text{g/ml}$ で

あったのに対し、他は重症筋無力症の1名を除いてすべて検出限界 ( $3\mu\text{g/ml}$ ) 以下であった。したがって、自己抗体の検出はIPAPの血清診断に使えることがわかった。

抗GM-CSF自己抗体によって一元的にIPAPの病態が説明できるとすれば、その抗体価は病勢を反映するかもしれない。臨床家ならば誰もそう考えるに違いない。しかし、近畿中央病院の井上部長らによるわが国の症例59名の検討では、自己抗体価は呼吸機能(動脈血酸素分圧、努力肺活量、肺拡散能)、血清パラメータ[CEA(癌胎児性抗原)、KL-6]のいずれとも相関しなかった。その後、自己抗体のGM-CSF分子上のエピトープをあらかじめエピトープが判明しているマウスモノクローナル抗体と拮抗阻害させることにより調べると、患者によって認識する部位は多様であることがわかり、現在、エピトープと病勢の相関を調査中である。

## サイトカインに対する自己抗体はなぜできるのか

サイトカインに対する自己抗体はGM-CSFのほか、これまでにIL-1 $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、G-CSFなどが報告されている<sup>13-15)</sup>。それらに共通した性質は、抗原であるサイトカインとの非常に強いavidity(親和力)である<sup>16)</sup>。筆者らが測定したIPAPの患者抗GM-CSF自己抗体のavidityは数pM~数十pMであり、文献に報告された他のサイトカイン自己抗体と一致している。サイトカインとそのレセプターとの親和力が大体このオーダーであることを考えると、この値がサイトカインの生物活性に拮抗するために必要な親和力である。これに対して、自己免疫疾患時にみられる自己抗体の抗原との親和力は $\mu\text{M}$ ~ $\text{nM}$ のオーダーであり、本質的に性質が異なるものかもしれない。

なぜサイトカインに対する自己抗体ができるのかという問題は、現在のところ、まったく推測の域を出ていない。Svensonらは、ボックスウイルスがIFN- $\alpha/\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IFN- $\gamma$ などの

レセプターアナログをもち、これらのサイトカインを中和することに注目している。これらのアナログレセプターとサイトカインとの複合体が抗原として認識されると、サイトカインに反応するB細胞が形質細胞に分化して自己抗体を産生するようになるというものである<sup>17)</sup>。

しかし、すべての抗サイトカイン自己抗体がウイルス感染が引き金となって産生されるようになると思われるのは少し難しいかもしれない。最近、Kurdowskaらは、抗IL-8自己抗体について大変興味深い報告をしている<sup>18)</sup>。抗IL-8自己抗体およびその免疫複合体は健常者血漿中の55%および13%に検出されるが、成人呼吸促迫症候群(ARDS)の患者の発症後に急速に増加し、増加した患者ほど予後がよいという。ARDSは好中球が肺胞に浸潤し、炎症によって呼吸機能が急速に低下する疾患として知られるが、抗IL-8自己抗体は抗中球の遊走を抑え、炎症を収束に向かわせる因子として働いているのかもしれない。

このように考えると、抗GM-CSF自己抗体もなんらかの機能をもって、もともとヒトに備わっている抗体と考えることもできる。健常者血漿では、これらの自己抗体濃度が低すぎて測定できないか、あるいは複合体を形成していて検出できないのかもしれない。

## なぜ肺だけに病変ができるのか

前述したように、GM-CSF欠損肺胞蛋白症モデルマウスにおいてもヒトIPAPにおいても肺だけに病変がみられるのはなぜであろうか。この疑問に対する正確な答えはまだない。GM-CSF産生細胞は全身の上皮系、内皮系、間質線維芽細胞、リンパ球、マクロファージなどに広く分布しており、この欠損が他の臓器に影響を及ぼさないのは一見して奇異な感じを受ける。この答えとしてまず考えられるのは、サイトカインの重複性ということがあげられよう。IL-3、IL-5は、GM-CSFレセプターとcommon $\beta$ 鎖を共有しており、それらのサイトカインによって機能が補われている可能性がある。逆に肺において



はなぜ、肺胞マクロファージの機能不全が補われな  
いのだろうか。健全な肺は非常にGM-CSFが豊富  
な臓器である。この環境で分化した肺胞マクロファ  
ージはGM-CSFによって過成熟を起こすと考えら  
れる。肺胞マクロファージが他のマクロファージと  
違って、活性酸素産生能が弱く、カタラーゼ産生能  
が強いことなどは、GM-CSFによる分化のためと  
考えられる。高濃度のGM-CSFはIL-3レセプター  
の発現を抑え、GM-CSF依存性の分化をより促進  
させているのかもしれない。

## GM-CSFの投与はなぜ、特発性肺胞蛋白症を 寛解に導くのか

最近、米国、オーストラリア、スイスで、IPAP  
にGM-CSFの皮下注療法が有効であるという報告  
が出てきている<sup>19, 20)</sup>。通常、自己抗体が原因である  
とすれば、抗原であるGM-CSFの投与は抗体の産  
生を促すこととなり、禁忌のはずである。しかし、  
Seymourらによれば、投与を受けた13名の患者の  
うち6名に血中酸素分圧の改善、胸部レントゲン写  
真の改善、呼吸困難などの症状の改善が認められた。  
ついで、わが国において東北大学、近畿中央病院で  
重症患者3名にGM-CSF吸入療法を行ったところ、  
いずれも著効を示した。これらの患者肺洗浄液中の  
抗GM-CSF自己抗体を調べたところ、治療前の抗

体価よりも治療後の抗体価が大幅に低下していた。  
この機序は不明であるが、肺の自己抗体をすべて中  
和するには投与したGM-CSFは少なすぎるることか  
ら、抗原の投与により脱感作が生じた可能性も考え  
られる。

1994年にDranoffらがGM-CSFノックアウトマ  
ウスの肺胞蛋白症を発見して以来、世界中の分子生  
物学者が患者のGM-CSFレセプターやシグナル伝  
達物質の異常を研究した。1997年にIPAPの病因研  
究を始めたとき、筆者の研究室は貧しくて分子生物  
学的手法を駆使するための機材がなかった。しかし、  
私の手もとには、何よりも強い武器—患者の気管支  
肺胞洗浄液と詳細な臨床情報があった。Dranoffは  
ヒントを与えてくれたが、最後の一步はノックアウ  
トマウスではわからなかった。犯人を執拗に追いか  
ける現場担当の聞き込み刑事のように、臨床検体と  
患者の情報をを用いた探求が、抗GM-CSF自己抗体  
の発見に導いてくれたのだと思う。

研究技術の進歩がかえって、病因解明を遅らせて  
しまうこともある。特に若い研究者は、先端技術に  
目を奪われて、それを駆使することに躍起になり、  
かえって疾病の本質をみようとししない。もう一度、  
患者の病態と患者検体の観察に立ち戻ることが重要  
なのではないだろうか。

---

## 文献

- 1) Sorokin SP, Hoyt RF Jr, Reenstra WR et al. Factors influencing fetal macrophage development : III. Immunocytochemical localization of cytokines and time-resolved expression of differentiation markers in organ-cultured rat lungs. *Anat Rec* **248**, 93 (1997)
- 2) Golde DW, Finley TN, Cline MJ et al. The pulmonary macrophage in acute leukemia. *N Engl J Med* **290**, 875 (1974)
- 3) Thomas ED, Rambergh RE, Sale GE et al. Direct evidence for bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* **192**, 1016 (1976)
- 4) Yoshida M, Ikegami M, Reed JA, Chronos ZC & Whitsett JA. GM-CSF regulates protein and lipid catabolism by alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L379 (2001)
- 5) Shibata Y, Berclaz P-Y, Trapnell B et al. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* **15**, 557 (2001)
- 6) Honda Y, Takahashi H, Shijubo N et al. Surfactant protein-A concentration in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* **103**, 496 (1993)
- 7) Ikegami M, Ueda T, Hull W et al. Surfactant metabolism in transgenic mice after granulocyte

- macrophage-colony stimulating factor ablation. *Am J Physiol* **270**, L650 (1996)
- 8) Tanaka N, Watanabe J, Kitamura T et al. Lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis express a factor which neutralizes granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *FEBS Lett* **442** (2-3), 246 (1999)
  - 9) Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J et al. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J Exp Med* **190**, 875 (1999)
  - 10) Kitamura T, Uchida K, Tanaka N et al. Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Dis Crit Care Med* **162**, 658 (2000)
  - 11) Svenson M, Hansen MB, Ross C et al. Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood* **91**, 2054 (1998)
  - 12) Meager A, Wadhwa M & Bird C. Spontaneously occurring neutralizing antibodies against granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with autoimmune disease. *Immunology* **97**, 526 (1999)
  - 13) Revoltella R. Natural and therapeutically-induced antibodies to cytokines. *Biotherapy* **10**, 321 (1998)
  - 14) Caruso A, Foresti I, Gribaudo G et al. Anti-interferon- $\gamma$  antibodies in sera from HIV infected patients. *J Biol Reg Homeost Agents* **3**, 8 (1989)
  - 15) Laricchia-Robbio L, Moscato S, Genua A, Liberati AM & Revoltella RP. Naturally occurring and therapy-induced antibodies to human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in human serum. *J Cell Physiol* **173**, 219 (1997)
  - 16) Svenson M, Hansen M & Bendtzen K. Binding of cytokines to pharmaceutically prepared human immunoglobulin. *J Clin Invest* **92**, 2533 (1993)
  - 17) Bendtzen K, Hansen M, Ross C & Svenson M. High-avidity autoantibodies to cytokines. *Immunol Today* **19**, 209 (1998)
  - 18) Kurdowska A, Miller E, Noble J et al. Anti-IL-8 autoantibodies in alveolar fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome. *J Immunol* **157**, 2699 (1996)
  - 19) Kavuru MS, Sullivan EJ, Piccin R et al. Exogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administration for pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1143 (2000)
  - 20) Seymour JF, Presneill JJ, Schoch OD et al. Therapeutic efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 524 (2001)

# High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis

Kanji Uchida, Koh Nakata, Bruce C. Trapnell, Takahiro Terakawa, Emi Hamano, Ayako Mikami, Ikumi Matsushita, John F. Seymour, Masayoshi Oh-eda, Ikuo Ishige, Yoshinobu Eishi, Takayuki Kitamura, Yoshitsugu Yamada, Kazuo Hanaoka, and Naoto Keicho

**Deficiency of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in mice results in pulmonary alveolar proteinosis (PAP) from impaired surfactant catabolism by alveolar macrophages (AMs). Recently, we have shown that neutralizing anti-GM-CSF autoantibodies develop specifically in patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis (iPAP). Analogous to murine PAP models, it is plausible that the autoantibodies reduce GM-CSF activity, resulting in AM dysfunction and surfactant accumulation. To examine this hypothesis, we estimated the neutralizing activity of the auto-**

**antibodies in the lungs of patients and characterized their biologic properties. GM-CSF bioactivity was completely abrogated in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with iPAP but not in healthy subjects. Autoantibodies were present in the alveoli in high concentrations and colocalized with GM-CSF. They recognized human GM-CSF with high avidity ( $K_{AV} = 20.0 \pm 7.5$  pM) and high specificity, reacting with its superstructure and neutralizing GM-CSF activity to a level 4000 to 58 000 times the levels of GM-CSF normally present in the lung. Although target epitopes varied among**

**patients, GM-CSF amino acids 78 to 94 were consistently recognized. Thus, autoantibodies bind GM-CSF with high specificity and high affinity, exist abundantly in the lung, and effectively block GM-CSF binding to its receptor, inhibiting AM differentiation and function. Our data strengthen the evidence associating anti-GM-CSF autoantibodies with the pathogenesis of this disease. (Blood. 2004;103:1089-1098)**

© 2004 by The American Society of Hematology

## Introduction

Pulmonary alveolar proteinosis (PAP) is a rare lung disorder characterized by the excessive accumulation of surfactant lipids and proteins in alveoli, resulting in impaired gas exchange and respiratory insufficiency.<sup>1-3</sup> Clinically, PAP is divided into congenital, secondary, and idiopathic forms, with the latter comprising more than 90% of cases.<sup>2</sup> Idiopathic PAP (iPAP) has a variable clinical course ranging from spontaneous remission to respiratory failure, and it can be complicated by secondary infections, frequently with opportunistic pathogens.<sup>2</sup>

The pathogenesis of iPAP is unknown. However, the observation that histologically similar PAP occurs in mice genetically deficient in granulocyte macrophage–colony-stimulating factor (GM-CSF) ( $GM^{-/-}$  mice) or its receptor ( $GM\ R\beta c^{-/-}$  mice) suggested that an abnormality in GM-CSF signaling may be involved.<sup>4-7</sup> Clearance of surfactant lipids and surfactant proteins by alveolar macrophages (AMs) in these mice is severely impaired, thus providing an explanation for the increase in surfactant accumulation.<sup>8</sup> Murine PAP can be corrected by the local expression of GM-CSF in the lungs ( $GM^{-/-}$  mice)<sup>9-12</sup> or by bone marrow transplantation from a wild-type ( $GM\ R\beta c^{-/-}$ ) mouse.<sup>13</sup> AMs from

$GM^{-/-}$  mice also display a number of molecular, morphologic, and functional abnormalities in addition to defective surfactant catabolism, all of which are corrected by the reconstitution of GM-CSF in the lungs.<sup>9-11,14,15</sup> AMs from  $GM^{-/-}$  mice are deficient in the macrophage-differentiation-inducing transcription factor, PU.1: the presence and level of PU.1 in AMs is determined by the presence and level of GM-CSF in the lung.<sup>12,16,17</sup> Furthermore, retroviral-mediated PU.1 expression in cultured  $GM^{-/-}$  AMs corrects all the observed AM defects described above, including surfactant protein catabolism.<sup>12</sup> These data show that GM-CSF exerts its critical role over surfactant homeostasis by acting locally in the murine lung and stimulating AM terminal differentiation.<sup>12,15-17</sup>

Several lines of evidence suggest that GM-CSF bioactivity in the lung is also critical for surfactant homeostasis in humans. First, the histopathologic abnormalities of the lung in iPAP in humans strongly resemble those of  $GM^{-/-}$  mice.<sup>1,4-7,18,19</sup> Second, AMs in murine and human iPAP share a number of similar morphologic and functional abnormalities, including large “foamy” appearance,<sup>4,5,18,20</sup> decreased phagocytosis,<sup>14,16,18,19,21</sup> and reduced cellular adherence.<sup>14,18</sup> Third, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and

From the Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo; Department of Anesthesiology, Tokyo University Graduate School of Medicine; Bio-Product Technology Laboratory, Chugai Pharmaceutical, Tokyo; Department of Pathology, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine; Department of Anesthesiology, Yokohama-city University School of Medicine, Kanagawa, Japan; Cincinnati Children's Hospital Medical Center, OH; and Department of Haematology, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia.

Submitted May 27, 2003; accepted September 16, 2003. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, September 25, 2003; DOI 10.1182/blood-2003-05-1565.

Supported by a Grant-in-Aid for Translational Research (no. H14-trans-014) from the Japanese Ministry of Labor, Health, and Welfare.

**Reprints:** Koh Nakata, Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-city, Tokyo 162-8655; e-mail: knak@ri.imcj.go.jp.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2004 by The American Society of Hematology

sera from patients with iPAP contain polyclonal autoantibodies (hereafter referred to as autoantibodies) that bind and neutralize human GM-CSF.<sup>22-24</sup> Fourth, these autoantibodies are specific for iPAP and have not been detected in patients with congenital or secondary PAP, other lung diseases, or healthy persons.<sup>22,23</sup> Because physiological levels of GM-CSF protein are normally low, including levels in the lungs that are on the order of several picograms per milliliter BALF,<sup>25</sup> the presence of neutralizing autoantibodies might have an important effect on GM-CSF bioactivity levels in the lung.

Based on these findings in animals and humans, we hypothesized that autoantibodies in iPAP bind and neutralize GM-CSF, thus producing a functional GM-CSF deficiency in the lungs. This reduces GM-CSF bioactivity in the lungs to levels below the threshold required for the maintenance of normal AM functions, including surfactant catabolism. To address this hypothesis, we established a GM-CSF bioassay and used this to measure GM-CSF bioactivity levels in the BALF of iPAP patients and controls and to evaluate the relationship between pulmonary autoantibody levels and GM-CSF bioactivity. In addition, the avidity and specificity of binding to GM-CSF, neutralizing capacity, and GM-CSF-binding epitopes were determined for autoantibodies from a number of iPAP patients. Results indicate that GM-CSF-neutralizing capacity in the lungs is in vast excess of pulmonary GM-CSF levels, demonstrating that anti-GM-CSF antibodies are functionally important in iPAP, where they eliminate GM-CSF activity and thus GM-CSF-dependent signaling in the lung.

## Patients, materials, and methods

### Study subjects

All clinical samples were collected from 7 hospitals in Japan participating in the study of iPAP after written, informed consent was obtained under protocols approved by the institutional review boards of the 7 participating hospitals. A diagnosis of iPAP was suspected from historical, physical, radiographic, and laboratory data and was confirmed by biochemical analysis of BALF, pulmonary histopathologic findings, or both. None of the iPAP patients had a history of intercurrent or antecedent illnesses associated with secondary PAP,<sup>2</sup> including hematologic disorders, infectious disease, or toxic pulmonary inhalation syndromes. None of the patients or subjects reported here have been included in prior reports on PAP from our group, and none had received treatment with exogenous GM-CSF. Sera were obtained from 107 patients with iPAP, 19 healthy control subjects, and 10 patients with other lung diseases (idiopathic pulmonary fibrosis [ $n = 3$ ], sarcoidosis [ $n = 3$ ], acute respiratory distress syndrome [ $n = 2$ ], collagen vascular disease [ $n = 2$ ]). BALF was obtained from 34 patients with iPAP, 18 healthy control subjects, and 14 patients with other lung diseases (eosinophilic pneumonia [ $n = 4$ ], idiopathic pulmonary fibrosis [ $n = 4$ ], sarcoidosis [ $n = 3$ ], hypersensitivity pneumonitis [ $n = 2$ ], eosinophilic granuloma [ $n = 1$ ]). Open-lung biopsy specimens were obtained from 4 patients with iPAP and 4 patients undergoing resection of surgically operable lung cancer.

### Reagents

**GM-CSFs.** The following recombinant GM-CSFs were kindly provided by the researchers or companies indicated: human (rhGM-CSF), *Escherichia coli* derived (Kirin Brewery, Takasaki, Japan), Chinese hamster ovary (CHO) cell derived (Novartis Pharma, Basel, Switzerland), yeast derived (Immunex, Seattle, WA); murine (Kirin Brewery); bovine (Dr Yuichi Yokomizo, National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan). Iodine-125 (<sup>125</sup>I)-Bolton-Hunter-labeled rhGM-CSF (*E coli* derived) was purchased from NEN Life Science Products (Boston, MA). Recombinant carboxymethylated GM-CSF was produced according to the method

described previously.<sup>26</sup> Trypsin-digested rhGM-CSF was prepared as described.<sup>27</sup>

**Other cytokines.** Recombinant human interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

**Antibodies.** A polyclonal, epitope-specific, rabbit antihuman GM-CSF antibody was obtained after immunization with an rhGM-CSF peptide comprised of amino acid residues 54 to 73 and was purified by affinity chromatography. Epitope-specific murine antihuman GM-CSF monoclonal antibody sets 4117, 1089, 3092, and 1022, which recognize amino acid residues 1 to 11, 40 to 77, 78 to 94, and 110 to 127, respectively, of rhGM-CSF<sup>28</sup> were kindly provided by Dr Kanakura (Osaka University Medical School, Japan).

**Cell line.** A GM-CSF-dependent cell line, TF-1,<sup>29</sup> was kindly provided by Dr Kitamura (University of Tokyo, Japan).

### Human alveolar macrophage cultures

Using flexible bronchoscopy, human AMs were obtained from iPAP patients and controls under conscious sedation and local anesthesia (lidocaine). Briefly, three 50-mL aliquots of normal saline were instilled and suctioned sequentially from the right middle lobe or lingula. Cells were enumerated by hemocytometer, cytocentrifuge sediments were prepared and stained with Diff-Quick, and differential cell counts were performed on 500 cells per person. AMs were isolated by adhesion to plastic culture dishes for 1 hour. Adherent cells were seeded into 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) in RPMI 1640 medium with or without 20% (vol/vol) cell-free BALF from either iPAP patients or healthy controls. In some experiments, the culture medium also contained rhGM-CSF (20 ng/mL). Cells were incubated for 14 days (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Cell viability was measured by trypan blue dye exclusion, and cell growth was measured by the 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) assay method, as described previously.<sup>22,30</sup>

### Immunohistochemical localization of GM-CSF

GM-CSF was localized in the lung by immunohistochemical staining on paraffin-embedded lung sections from 4 iPAP patients or 4 controls using a monoclonal murine antihuman GM-CSF antibody (R&D Systems), as described previously.<sup>31</sup> Control lung tissues were obtained from the normal lung parenchyma of surgical specimens removed for the resection of lung cancer nodules. Immunohistochemical staining for surfactant apoprotein A (SP-A) was used to identify alveolar type II cells using a murine antihuman SP-A antibody (DAKO, Carpinteria, CA) as above. Color development was performed using 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) liquid substrate chromogen (DAKO) for GM-CSF and diaminobenzidine (DAB) (Nichirei, Tokyo, Japan) for SP-A.

### Quantification of GM-CSF bioactivity

TF-1 cells ( $2 \times 10^4$  cells/well) were cultured (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in microtiter plates for 3 days in macrophage-SFM medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing rhGM-CSF in concentrations ranging from 0 to 20 ng/mL without or with BALF (20% vol/vol) from iPAP patients or healthy controls. TF-1 cell survival was evaluated using the MTT assay (Sigma-Aldrich) as described previously.<sup>22,30</sup> The percentage of cell survival was calculated using the equation, cell survival (%) =  $100 \times (A - B)/(C - B)$ , where  $A$  is the absorbance of TF-1 cells grown in the presence of rhGM-CSF and BALF,  $B$  is the absorbance of TF-1 cells grown in medium only, and  $C$  is the absorbance of TF-1 cells grown without BALF but containing GM-CSF (20 ng/mL). The concentration of exogenously added rhGM-CSF that was required for 50% survival of TF-1 cells ( $SC_{50}$ , ng/mL) in each sample was determined. GM-CSF bioactivity was determined using the equation GM-CSF bioactivity =  $SC_{50}(C) - SC_{50}(B)$ , where GM-CSF bioactivity is expressed as nanogram equivalents of GM-CSF/mL BALF,  $SC_{50}(C)$  is the concentration of exogenously added rhGM-CSF required for 50% survival of cells without added BALF, and  $SC_{50}(B)$  is the concentration of exogenously added rhGM-CSF required for 50% survival of cells in